

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 106369 (13) C2****(51) МПК (2014.01)****C07K 1/18 (2006.01)****C07K 1/20 (2006.01)****C07K 14/59 (2006.01)****A61K 38/04 (2006.01)****A61P 15/00**

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2011 12796	(72) Винахідник(и): Шеккерманн Крістіан (DE), Айхінгер Дітмар (DE), Арнольд Штефан (DE)
(22) Дата подання заявки: 01.04.2010	(73) Власник(и): РАЦІОФАРМ ГМБХ, Graf-Arco-Strasse 3, 89079 Ulm, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 26.08.2014	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 09157133.1	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2003059898 A1, 27.03.2003. WO 2007065918 A1, 14.07.2007. WO 2006051070 A1, 18.05.2006. WO 0063248 A2, 16.04.2000.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 01.04.2009	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.02.2012, Бюл.№ 3	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.08.2014, Бюл.№ 16	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2010/002111, 01.04.2010	

(54) СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФСГ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу очищення рекомбінантного фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) або варіанта рекомбінантного ФСГ. Спосіб включає стадії, на яких рідину, що містить рекомбінантний ФСГ або варіант рекомбінантного ФСГ, піддають аніонообмінній хроматографії, хроматографії гідрофобної взаємодії і хроматографії по спорідненості до барвника, причому ці хроматографічні стадії можуть бути виконані в будь-якому порядку, і причому даний спосіб не включає ні слабку аніонообмінну хроматографію, ні хроматографію з оберненою фазою. В результаті способу очищення одержують високий вихід рекомбінантного ФСГ з необхідною мірою чистоти. Одержаний ФСГ є надзвичайно ефективним для профілактики і лікування захворювань і медичних показань, при яких препарати ФСГ вважаються ефективним засобом лікування.

UA 106369 C2

Даний винахід стосується способу очищення рекомбінантного фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) або варіанта рекомбінантного ФСГ. Спосіб включає стадії, на яких рідину, що містить рекомбінантний ФСГ або варіант рекомбінантного ФСГ, піддають аніонообмінній хроматографії, хроматографії гідрофобної взаємодії і хроматографії по спорідненості до барвника, причому ці хроматографічні стадії можуть бути виконані в будь-якому порядку, і причому даний спосіб не включає ні слабку аніонообмінну хроматографію, ні хроматографію з оберненою фазою. В результаті способу очищення одержують високий вихід рекомбінантного ФСГ з необхідною мірою чистоти. Одержаний ФСГ є надзвичайно ефективним при профілактиці і лікуванні захворювань і медичних показаннях, при яких препарати ФСГ вважаються ефективним засобом лікування.

Фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) продукується гонадотропними клітинами передньої частки гіпофіза і виділяється в кровотік. ФСГ діє спільно з лютеїнізуючим гормоном (ЛГ) при контролі дозрівання ооцитів у жінок і сперматогенезу у чоловіків. І ФСГ, і ЛГ належать до сімейства гетеродимерних глікопротеїнів, які складаються з двох нековалентно зв'язаних α - і β -ланцюгів, які кодуються різними генами. І α -, і β -ланцюги є глікозилованими. α -субодина складається з 92 амінокислотних залишків, в той час як β -субодина складається з 111 амінокислотних залишків, кожна з яких має дві потенційних аспарагінзв'язаних ділянки глікозилювання.

ФСГ людини використовують для лікування жінок, страждаючих відсутністю овуляції, для стимуляції множинної овуляції (суперовуляції) і при підготовці до штучного запліднення, такого як ЕКЗ, ІКСІ, GIFT (перенесення гамет в маточну трубу) або CIFT. Крім того, ФСГ людини використовують для стимуляції дозрівання фолікулів у жінок з низькою або відсутньою секрецією ФСГ і для стимулювання сперматогенезу у чоловіків, страждаючих олігоспермією.

При стандартній схемі лікування для стимуляції овуляції, пацієнтці призначають щоденні ін'єкції ФСГ або варіанта (приблизно від 75 до 450 МО ФСГ/день) протягом періоду від приблизно 6 до приблизно 12 днів. При стандартній схемі лікування для контрольованої гіперстимуляції яєчників, пацієнтці призначають щоденні ін'єкції ФСГ або варіанта (приблизно від 150 до 600 МО ФСГ/день) протягом періоду від приблизно 6 до приблизно 12 днів.

Для стимуляції сперматогенезу, схема лікування з використанням 150 МО ФСГ три рази на тиждень в комбінації з 2500 МО хоріонічного гонадотропного гормону людини (hCG) два рази на тиждень була результативна для досягнення підвищення числа сперматозоїдів у чоловіків, страждаючих гіпогонадотропним гіпогонадізмом.

До 1980-х років основним джерелом людського ФСГ був ФСГ, присутній в сечі, виділений з сечі жінок дітородного віку. Далі, в 1990-х роках була представлена очищена форма високочистого ФСГ, одержаного з сечі, і в кінцевому результаті, рекомбінантний ФСГ був створений і широко розповсюджений з 1998 року. З появою методу рекомбінантних ДНК стало можливо синтезувати людський ФСГ в клітинних культурах, трансфектованих послідовностями нуклеїнових кислот, що кодують α - і β -ланцюг. Послідовності ДНК, що кодують α - і β -ланцюги, і способи синтезу рекомбінантного ФСГ були розкриті, наприклад, в міжнародній публікації WO 88/10270, WO 86/04589 і EP 0735139.

На даний час існують два комерційних продукти рекомбінантного людського ФСГ на ринку Німеччини, GONAL-f® і Puregon®, обидва одержані в результаті експресії послідовностей ДНК, що кодують людські α - і β -ланцюги дикого типу в клітинах яєчника китайського хом'ячка (CHO).

Внаслідок важливості ФСГ при лікуванні порушень фертильності, необхідне забезпечення рекомбінантним ФСГ високої чистоти і високої специфічної активності. Лікування за допомогою ФСГ вимагає багаторазових ін'єкцій. Високоочищені препарати ФСГ можна вводити підшкірно, що забезпечує введення ліків пацієнтом самостійно, без контролю лікаря, тим самим збільшуючи зручність застосування і додержання режиму лікування пацієнтом.

У міжнародній патентній заявці WO 2006/051070 A1, що належить Ares Trading S.A., описаний спосіб очищення рекомбінантного ФСГ, який включає наступні стадії: 1) хроматографія по спорідненості до барвника, 2) хроматографія гідрофобної взаємодії і 3) хроматографія з оберненою фазою. Крім того, в WO 2006/051070 A1 розкритий спосіб очищення ФСГ, який включає стадії, на яких ФСГ піддають 1) аніонообмінній хроматографії, 2) хроматографії по спорідненості до барвника, 3) хроматографії гідрофобної взаємодії, 4) хроматографії з оберненою фазою і 5) аніонообмінній хроматографії.

Міжнародна патентна заявка WO 2005/063811 A1, що належить Ares Trading S.A., стосується способу очищення рекомбінантного людського ФСГ, який включає стадії (1) іонообмінної хроматографії; (2) хроматографії з іммобілізованими іонами металу і (3) хроматографії гідрофобних взаємодій (HIC).

У міжнародній патентній заявці WO 2007/065918 A2, що належить Ares Trading S.A., описаний спосіб очищення ФСГ, який включає стадії хроматографії: хроматографія по спорідненості до барвника, слабка аніонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобних взаємодій і сильна аніонообмінна хроматографія, які можуть бути виконані в будь-якому порядку.

Існує постійна потреба в нових способах очищення рекомбінантного ФСГ і варіантів ФСГ. Зокрема, існує потреба в способах очищення, які дозволяють уникнути здійснення стадій хроматографії з оберненою фазою. Крім того, бажано мати спосіб очищення, який не оснований на імуноафінній хроматографії, але може бути здійснений без цієї дорогої стадії.

Відповідно до даного винаходу, ця і додаткові проблеми вирішені за допомогою ознак, включених в основний пункт формули винаходу. Переважні варіанти здійснення визначені в залежних пунктах формули винаходу.

Метою винаходу є розробка нового, ефективного способу очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта рекомбінантного ФСГ.

У першому аспекті, винахід стосується способу очищення рекомбінантного людського ФСГ або варіанта ФСГ, виходячи з рідини, що містить неочищений ФСГ, який включає наступні стадії:

- аніонообмінна хроматографія,
- хроматографія гідрофобних взаємодій і
- хроматографія по спорідненості до барвника,

які можуть бути здійснені в будь-якому порядку, причому даний спосіб дозволяє уникнути застосування будь-якої слабкої аніонообмінної хроматографії, а так само будь-якої хроматографії з оберненою фазою.

У іншому варіанті здійснення, інші стадії хроматографії здійснюються в наступному порядку: (1) аніонообмінна хроматографія, (2) хроматографія гідрофобних взаємодій і (3) хроматографія по спорідненості до барвника. Аніонообмінна хроматографія (АЕС) основана на взаємодіях заряд-заряд між білками в даному зразку і зарядами, іммобілізованими на смолі. У аніонообмінній хроматографії зв'язуючі іони даних білків є негативними, а іммобілізована функціональна група є позитивною. Поширеними аніонообмінними смолами є Q-смола, четвертинний амін і смола DEAE (DiEthylAminoEthane, ДіЕтилАміноЕтан). Проте, в більшості випадків, стадія аніонообмінної хроматографії може бути здійснена зі всіма стандартними комерційно доступними аніонообмінними смолами або мембранами. Аніонообмінні смоли можуть бути використані у вигляді попередньо залитих колонок. Альтернативно, колонки можна підготувати самостійно. За винятком звичайних, не існує ніяких специфічних обмежень відносно місткості і конфігурації колонок. Фахівець знає, що кількість використовуваної аніонообмінної смоли залежить від загального вмісту білка в рідині клітинної культури або будь-якій іншій рідині, наприклад елюаті, одержаному на попередній стадії хроматографії, внесений в колонку на стадії поглинання.

Стандартні сильні аніонообмінні смоли, які можна використовувати з метою даного винаходу, містять такі функціональні групи, як: молекули четвертинного аміноетила (QAE), смоли включають, наприклад, Toyopearl QAE (є в наявності у Tosoh Bioscience, Germany), Selectacel QAE (четвертинний аміноетил, похідне целюлози, є в наявності у Polysciences Inc., Pennsylvania USA) і інші; молекули четвертинного амонію (Q), смоли включають, наприклад, Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Q Sepharose HP (є в наявності у GE Healthcare, Germany), Resource Q (є в наявності у GE Healthcare, Germany), Macro Prep High Q (Bio-Rad, California, USA), Toyopearl Super Q (є в наявності у Tosoh Bioscience, Germany), UNOsphere Q (є в наявності у Bio-Rad, California, USA), і групи триметиламонійетила (TMAE), смоли включають, наприклад, Fractogel EMD TMAE (є в наявності у Merck, Germany).

Аніонообмінна хроматографія переважно являє собою сильну аніонообмінну хроматографію, яка здійснюється з використанням сильної аніонообмінної смоли, що має функціональні групи $-N+(CH_3)_3$, або смоли з аналогічними характеристиками.

Переважають приклади сильних аніонообмінних смол, які можуть бути використані з метою винаходу, являють собою сильні аніонообмінні смоли з четвертинним амонієм, відомі в рівні техніки як UNOsphere Q, Q Sepharose HP і інші смоли, що мають молекули четвертинного амонію (Q).

Характерними особливостями сильної аніонообмінної смоли UNOsphere Q є наступні:

Функціональна група	$-N+(CH_3)_3$
Загальна іонна місткість	120 мкекв./мл
Динамічна зв'язуюча місткість	150 см/год.

	180 мг/мл
	600 см/год.
	125 мг/мл
Транспортний протиіон	Cl ⁻
Середній розмір частинок	120 мкм
Рекомендований діапазон лінійної швидкості потоку	50-1200 см/год.
	1,0 М NaOH (20 °C) до
Хімічна стабільність	2000 годин
	1,0 М HCl (20 °C) до 200 годин
Зміни об'єму рН 4-10	<5 %
0,01-1,0 М NaCl	<5 %
рН стабільності	1-14

Характерними особливостями сильної аніонообмінної смоли Q Sepharose HP є наступні:

Іонна місткість	0,14-0,20 ммоль Cl ⁻ /мл
Динамічна місткість	70 мг BSA/мл середовища
Рекомендована швидкість потоку	30-150 см/год.
Макс. тиск на фільтруючий наповнювач протягом процесу	3 бар (42 фунти на кв. дюйм, 0,3 МПа)
Граничний тиск на конструктивні елементи колонки HiLoad	5 бар (73 фунти на кв. дюйм, 0,5 МПа)
Середній розмір частинок	34 мкм
Ексклюзійна межа (Mr)	приблизно 4×10 ⁶ глобулярний білок
Матриця	поперечношита агароза, 6 %
рН стабільності	2-12 (робочий і довгостроковий), 1-14 (короткостроковий)
Хімічна стабільність	стабільна у всіх поширених буферах

Переважає уникати використання слабких аніонообмінних смол, наприклад тих, в основі яких як функціональні групи присутні діетиламіноетил (DEAE) або диметиламіноетил (DMAE).

5 Стадію аніонообмінної хроматографії переважно здійснюють з використанням буфера, який має слабколужне значення рН, наприклад, приблизно від 7,0 до приблизно 9,0 або приблизно від 7,5 до приблизно 8,5. Придатні буфери включають, наприклад, боратний буфер, триетаноламін/імінодіоцтова кислота Tris, оцтовокислий амоній, трицин, біцин, TES, HEPES, TAPS. Переважним є використання буфера Tris. Елюювання з аніонообмінної смоли звичайно здійснюється за допомогою збільшення провідності рухомої фази внаслідок додавання солі, 10 переважно хлориду натрію.

З методів за винаходом, хроматографія гідрофобних взаємодій (HIC) може бути здійснена з використанням HIC-смоли, що має відносно помірно гідрофобну поверхню (в порівнянні з більш сильною гідрофобною поверхнею смоли для оберненої фази). Білки з властивостями гідрофобної поверхні притягуються до таких смол, які звичайно мають ефірні, фенільні, бутильні або гексильні групи. 15

НІС може бути здійснений зі всіма поширеними комерційно доступними НІС-смолами. НІС-смоли, які можуть бути використані з метою винаходу, включають такі матриці, як бутіл, феніл, пропіл або октилсефароза, SOURCE 15 (всі є в наявності у GE Healthcare, Germany), Macro-Prep Methyl або t-бутіл НІС-носій (Bio-Rad, Germany) або Fractogel EMD з пропільним або фенільним лігандами (Merck AG, Germany), смоли Toyopearl НІС, такі як Toyopearl Butyl 650 M і аналогічні НІС-смоли (Tosoh Bioscience).

У переважному варіанті здійснення, хроматографія гідрофобних взаємодій здійснена з використання смоли, що складається з гранул перехреснозшитої агарози, дереватизованих з фенільною, бутильною або октильною групами, або смоли, що має аналогічні характеристики. Нижче представлені характеристики фенілсефарози 6 FF (Phenyl Sepharose 6 FF) (є в наявності у GE Healthcare).

Густина ліганду	
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (low sub)	25 мкмоль/мл середовища
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (high sub)	40 мкмоль/мл середовища
Зв'язуюча здатність	
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (low sub)	10 мг IgG/мл середовища
	24 мг HSA/мл середовища
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (high sub)	30 мг IgG/мл середовища
	36 мг HSA/мл середовища
Тиск/специфікація обробки	200-400 см/год., 1 бар ХК 50/60 колонка, товщина шару 25 см
pH стабільності	2-14 (короткий час), 3-13 (тривалий час)
Хімічна стабільність	Стабільна в поширених буферах, хаотропних агентах, детергентах полярних органічних розчинниках
Середній розмір частинок	90 мкм
Зберігання	20 % етиловий спирт
Температура зберігання	від 4 °C до 30 °C

Зв'язування на НІС-смолі забезпечується в буфері з високою провідністю, досягнутою за допомогою додавання солі (наприклад, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ або Na_2SO_4). Елюювання на стадії НІС звичайно виконують за допомогою зниження провідності рухомої фази (тобто знижуючи концентрацію солі), використовуючи буфер, що має значення pH від приблизно 5 до приблизно 9, більш переважно від приблизно 6 до приблизно 8, найбільш переважно від приблизно 7 до приблизно 8.

Рівноважні, відмиваючі і елююючі буфери можуть включати всі типи буферів, звичайно використовуваних для НІС. Таким чином, буферні речовини включають фосфат натрію, ацетат натрію, Tris/HCl, HEPES або інші буферні речовини. Більше того, буфери можуть містити від 0,5 мМ до 3 М NaCl, KCl або інші придатні солі, залежно від того, чи використовується цей буфер для зрівноваження, відмивання або елюювання. Рівноважні і відмиваючі буфери містять більш високі концентрації вищезазначених солей, ніж буфери для елюювання.

Надзвичайно переважним буфером на стадії HIC є буфер Tris/HCl, що містить хлорид натрію.

З методів за винаходом, хроматографія по спорідненості до барвника може бути здійснена з використанням смоли, що має як іммобілізований ліганд склад барвника, який добре відомий фахівцю в рівні техніки, а саме Cibacron Blue F3G-A. Термін "іммобілізований" добре зрозумілий фахівцю і означає, що ліганд дериватизований, тобто хімічно зв'язаний зі смолою.

У переважному варіанті здійснення хроматографію по спорідненості до барвника здійснюють з Cibacron Blue F3G-A як лігандом, ковалентно сполученим з будь-яким матриксом, наприклад з агарозним матриксом. Переважно хроматографію по спорідненості до барвника здійснюють з використанням смоли, відомої як Blue Sepharose FF (є в наявності у GE Healthcare, Germany). Технічні характеристики Blue Sepharose FF представлені нижче:

Ліганд	Cibacron Blue F3G-A
Метод зв'язування ліганду	Зв'язування з триазином
Зв'язуюча здатність	>18 мг альбуміну сироватки людини/мл середовища
Густина ліганду	≈7 мкмоль Cibacron Blue/мл середовища
Матрикс	Агароза з високою частотою поперечних зв'язків, 6 %
Середній розмір частинок	90 мкм
pH стабільності	4-12 (тривалий час), 3-13 (короткий час)
Зберігання	20 % етиловий спирт, 1 М калійфосфатний буфер, pH 8,0
Температура зберігання	від 4 °C до 30 °C
Хімічна стабільність	40 °C протягом 7 днів в: 70 % етиловому спирті, 6 М гідрохлориді гуанідину, 8 М сечовині

Мається на увазі, що метод хроматографії по спорідненості до барвника за винаходом можна здійснити з альтернативними смолами, що мають аналогічні характеристики. Приклади альтернативних смол включають: Toyopearl AF-blue-HC-650M (Tosoh Biosciences), Blue Cellthru BigBead (Sterogene), SwellGel Blue (Pierce), Cibachrome blue 3GA-agarose 100 (Sigma), Affi-Gel Blue (Bio-Rad), Econo-Pac blue cartridges (Bio-Rad), Cibacron Blue 3GA (Sigma).

Елюювання на стадії хроматографії по спорідненості до іммобілізованого барвника переважно здійснюють з використанням буфера Tris/HCl або фосфатного буфера. Найбільш переважним є буфер Tris/HCl, що містить хлорид натрію. Значення pH елюенту переважно складає від приблизно 7 до приблизно 9, найбільш переважно значення pH знаходиться в діапазоні між 7 і 8.

У іншому аспекті, спосіб очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта ФСГ за даним винаходом включає стадії, на яких рідину, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ, піддають:

- аніонообмінній хроматографії,
- хроматографії гідрофобних взаємодій,
- хроматографії по спорідненості до барвника і,

крім того, катіонообмінній хроматографії, які можуть бути здійснені в будь-якому порядку, причому даний спосіб дозволяє уникнути застосування будь-якої слабкої аніонообмінної хроматографії, а також і будь-якої хроматографії з оберненою фазою.

У одному варіанті здійснення ці стадії проводять в наступному порядку: (1) аніонообмінна хроматографія, (2) хроматографія гідрофобних взаємодій, (3) хроматографія по спорідненості до барвника і (4) катіонообмінна хроматографія.

Катіонообмінна хроматографія (СЕС) основана на взаємодіях заряд-заряд між білками в зразку і зарядами, іммобілізованими на смолі. При катіонообмінній хроматографії зв'язуючі іони білків є позитивними, а іммобілізована функціональна група є негативною. Поширеними катіонообмінними смолами є S-смола, похідні сульфатів і SM (карбоксиметил) смоли, карбоксилвмісні похідні іони.

Проте, в більшості випадків, катіонообмінну хроматографію можна здійснити зі всіма поширеними комерційно доступними катіонообмінними смолами або мембранами. Катіонообмінні смоли можуть бути використані у вигляді попередньо залитих колонок або мембран, на яких зафіксована дана функціональна група, наприклад сульфенова кислота. Альтернативно, колонки можна підготувати самостійно. За винятком звичайних, не існує ніяких специфічних обмежень відносно місткості і конфігурації колонок. Фахівець знає, що кількість використовуваної катіонообмінної смоли залежить від загального вмісту білка в рідині клітинної культури або будь-якій іншій рідині, наприклад елюаті, одержаному на попередній стадії хроматографії.

Стандартні катіонообмінні смоли, які можна використовувати з метою винаходу, є в наявності у GE Healthcare і інших виробників пристроїв і колонок для іонообмінної хроматографії. Звичайно, СЕС здійснюється з використанням буферів, які мають значення рН в діапазоні від 4 до 7.

У переважному варіанті здійснення, стадію катіонного обміну за винаходом здійснюють у вигляді мембранного катіонного обміну. Переважно стадію катіонного обміну виконують з використанням сильного кислотного катіонного обмінника, сульфенової кислоти, зафіксованого на мембрані, або обмінника, що має аналогічні характеристики.

Придатні мембранні адсорбери для використання на стадії катіонного обміну за винаходом відомі в рівні техніки і є в наявності у декількох постачальників. Наприклад, катіонообмінна хроматографія за винаходом може бути здійснена з використанням мембрани, яка одержана з регенованої целюлози і має хроматографічний матрикс з сульфенової кислоти, сформованої на целюлозному каркасі. Прикладом ефективного мембранного адсорбера є мембранні адсорбери Sartobind S, що випускаються компанією Sartorius. Технічні характеристики мембранних адсорберів Sartobind S представлені нижче.

Назва	Sartobind SingleSep® (сильний кислотний катіонний обмінник S)
Ліганд	сульфенова кислота (R-CH ₂ -SO ₃ -)
Статична зв'язуюча здатність	≥0,8 мг/см ² (29 мг/мл), виміряна з бичачим сироватковим альбуміном і лізоцимом курячого яйця
Іонна місткість	4-6 мекв./см ²

Мембрана

Речовина основи	стабілізована целюлоза з підвищеною міцністю
Густина мембрани	275 мкм
Номинальний розмір пор	>3 мкм

Капсула

Конструкція	Циліндрична, номінальна кількість шарів 15
Товщина шару:	4 мм
Речовина капсули	Поліпропілен (FDA)
Макс. тиск	0,4 МПа (4 бар, 58 фунт/кв. дюйм)
рН стабільності	3-14 (короткий термін)
Зберігання	Утилізувати після одного застосування
Хімічна стабільність	Стабільна відносно всіх звичайно використовуваних в хроматографії буферів, 1 М NaOH (30-60 хв. при 20 °C), 8 М сечовини, 8 М гідрохлориду гуанідину, етилового спирту, ацетону і 100 % ацетонітрилу. Уникати окисників.

Стадія СЕС може бути здійснена відповідно до протоколу виробника. Наприклад, буфер Tris-HCl може бути використаний при значенні рН 7,0.

Було виявлено, що стадія СЕС, переважно стадія катіонного мембранного адсорбера, очищає білки клітини-хазяїна всіх розмірів молекулярного порядку, і в той же час забезпечує

коротку тривалість процесу. Вихід продукції, приблизно 95 %, є дуже сприятливим, оскільки ФСГ не зв'язується з адсорбером при значенні pH 7,0.

Загалом, було виявлено, що катіонообмінна хроматографія на хроматографічній мембрані є дуже ефективною при очищенні рекомбінантного ФСГ або варіанта ФСГ. Таким чином, в іншому аспекті, винахід стосується використання катіонного мембранного адсорбера в способі очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта ФСГ. У переважному варіанті здійснення, катіонний мембранний адсорбер являє собою катіонообмінний адсорбер, переважно сильний катіонообмінний адсорбер, який одержаний з регенованої целюлози і має хроматографічний матрикс з сульфенової кислоти, сформованої на даному целюлозному каркасі. У іншому аспекті, спосіб очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта ФСГ за винаходом включає стадії, на яких рідину, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ, піддають

- аніонообмінній хроматографії,
- хроматографії гідрофобних взаємодій,
- хроматографії по спорідненості до барвника,
- необов'язково, катіонообмінній хроматографії і

потім, додатковій аніонообмінній хроматографії, які можуть бути здійснені в будь-якому порядку,

причому спосіб дозволяє уникнути застосування будь-якої слабкої аніонообмінної хроматографії, а також будь-якої хроматографії з оберненою фазою.

У одному варіанті здійснення ці стадії проводять в наступному порядку: перша аніонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобних взаємодій, хроматографія по спорідненості до барвника, необов'язкова катіонообмінна хроматографія і друга аніонообмінна хроматографія.

Друга аніонообмінна хроматографія може бути здійснена із застосуванням стандартних аніонообмінних смол, як вказано вище застосовно до даної першої аніонообмінної хроматографії. Також друга аніонообмінна хроматографія переважно є сильною аніонообмінною хроматографією, здійсненою з використанням сильної аніонообмінної смоли, що має функціональні групи $-N^+(CH_3)_3$, або смоли, що має аналогічні характеристики. Переважні приклади сильних аніонообмінних смол, які можна використовувати з метою винаходу, являють собою сильні аніонообмінні смоли на основі четвертинного амонію, відомі в рівні техніки як UNOsphere Q, Q Sepharose HP і інші смоли, що мають молекули четвертинного амонію (Q). Характеристики сильних аніонообмінних смол UNOsphereQ і Q Sepharose HP наведені вище застосовно до першої аніонообмінної хроматографії. Також на стадії другої аніонообмінної хроматографії переважно уникати використання слабких аніонообмінних смол, наприклад таких, які основані на діетиламіноетилі (DEAE) або диметиламіноетилі (DMAE) як функціональних групах.

Стадію аніонообмінної хроматографії переважно здійснюють з використанням буфера, який має середньолужне значення pH, наприклад, від приблизно 7,0 до приблизно 9,0 або від приблизно 7,5 до приблизно 8,5. Придатні буфери включають, наприклад, боратний буфер, триетаноламін/іміндіоцтова кислота Tris, оцтовокислий амоній, трицин, біцин, TES, HEPES, TAPS. Переважним є використання буфера Tris. Елюювання з аніонообмінною смолою звичайно досягається за допомогою підвищення провідності рухомої фази в результаті додавання солі, переважно хлориду натрію.

У одному варіанті здійснення другу аніонообмінну хроматографію здійснюють з використанням буфера Tris-HCl/хлорид натрію як елюенту при значенні pH в діапазоні від 7,0 до 9,0.

У іншому аспекті, спосіб очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта ФСГ за винаходом включає стадії, на яких рідину, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ, піддають

- аніонообмінній хроматографії,
 - хроматографії гідрофобних взаємодій і
 - хроматографії по спорідненості до барвника,
- які можуть бути здійснені в будь-якому порядку,

причому даний спосіб дозволяє уникнути застосування будь-якої слабкої аніонообмінної хроматографії, а також будь-якої хроматографії з оберненою фазою, і причому даний спосіб додатково включає стадію ексклюзійної хроматографії.

У іншому аспекті, спосіб очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта ФСГ за винаходом включає стадії, на яких рідину, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ, піддають

- аніонообмінній хроматографії,
- хроматографії гідрофобних взаємодій,
- хроматографії по спорідненості до барвника,

- необов'язковій катіонообмінній хроматографії,
- необов'язковій додатковій аніонообмінній хроматографії і
- ексклюзійній хроматографії,

які можуть бути здійснені в будь-якому порядку,

5 причому спосіб дозволяє уникнути застосування будь-якої слабкої аніонообмінної хроматографії, а також будь-якої хроматографії з оберненою фазою.

У одному варіанті здійснення ці стадії здійснюють в наступному порядку: аніонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобних взаємодій, хроматографія по спорідненості до барвника, необов'язкова катіонообмінна хроматографія, необов'язкова додаткова

10 аніонообмінна хроматографія і ексклюзійна хроматографія.
У переважному варіанті здійснення, спосіб за винаходом включає наступні стадії в наступному порядку: перша аніонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобних взаємодій, хроматографія по спорідненості до барвника, необов'язкова катіонообмінна хроматографія, необов'язкова друга аніонообмінна хроматографія і ексклюзійна хроматографія.

15 Ексклюзійна хроматографія (SEC), також відома як гельфільтраційна хроматографія, являє собою хроматографічний метод, в якому частинки, наприклад білки і інші біомолекули, розділяються відповідно до їх розмірів. Типовим гелевим середовищем для SEC є поліакриламід, декстран, агароза або їх суміш. SEC-матрикси є в наявності у різних виробників обладнання і колонок для хроматографії, наприклад у Tosoh Bioscience LLC або GE Healthcare.

20 Ексклюзійну хроматографію переважно здійснюють з використанням матриксу зі сферичного композиту перехреснозшитого агарози і декстрану.

Прикладами придатних матриць для ексклюзійної хроматографії є матрикси, відомі в рівні техніка як Superdex 75 pg, що є в наявності, наприклад, у GE Healthcare. Колонки Superdex 75 pg забезпечують високочутливе розділення білків, пептидів і інших біомолекул відповідно до їх

25 розмірів. Як правило, колонки для ексклюзійної хроматографії є ідеальними на стадії доочищення в процесі очищення.

Технічні характеристики матриксу Superdex 75 наступні:

Ексклюзійна межа	1×10 ⁵
(Mr)	глобулярний білок
Діапазон розділення	3000-70000
(Mr)	глобулярний білок
	Сферичний композит
Матрикс	перехреснозшитий агарози і декстрану
Середній розмір частинок	34 мкм
	Стабільний у всіх поширених буферах: 1 М оцтова кислота, 8 М сечовина, 6 М гідрохлорид гуанідину, 30 % ізопропіловий спирт, 70 % етиловий спирт, 1 М NaOH (для очищення на місці)
Хімічна стабільність	3-12 (робочий і довгостроковий), 1-14 (короткостроковий)
pH стабільності	
Колонки Superdex™ 10/300 GL (Tricorn)*	
Розміри шару	10×300 мм
Рекомендований об'єм зразка	25-250 мкл

Об'єм шару	24 мл 18 бар (261
Макс. тиск	фунт/кв. дюйм, 1,8 МПа)
Макс. швидкість потоку (H ₂ O при 25 °C)	1,5 мл/хв. >30000 м-
Теоретичні тарілки	1
Колонки Superdex™ PC 3.2/30	
Розміри шару	3,2×300 мм
Об'єм шару	2,4 мл
Рекомендований об'єм зразка	2-25 мкл
	24 бар (348
Макс. тиск	фунт/кв. дюйм, 2,4 МПа)
Макс. швидкість потоку (H ₂ O при 25 °C)	0,100 мл/хв. >30000 м-
Теоретичні тарілки	1
	20 %
Зберігання	етиловий спирт
Температура зберігання	від 4 °C до 30 °C

5 Стадія SEC може бути здійснена відповідно до протоколу виробника. Наприклад, натрійфосфатний буфер можна використовувати при значенні pH від 6 до 8, переважно при pH приблизно 7,0.

У переважному варіанті здійснення винаходу, спосіб за винаходом включає наступні стадії в наступному порядку: перша аніонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобних взаємодій, хроматографія по спорідненості до барвника, катіонообмінна хроматографія, друга аніонообмінна хроматографія і ексклюзійна хроматографія.

У переважному варіанті здійснення стадію катіонообмінної хроматографії в способі за винаходом здійснюють на мембранному катіонообміннику. Переважно, катіонообмінну стадію проводять з сильним кислотним катіонообмінником сульфонові кислотою, зафіксованою на мембрані, або з обмінником, що має аналогічні характеристики.

Крім того, спосіб за винаходом включає одну або декілька стадій ультрафільтрації і/або нанофільтрації. Ультрафільтрація являє собою вид мембранної фільтрації, при якій гідростатичний тиск витісняє рідину через напівпроникну мембрану. Зважені речовини і розчинені речовини з високою молекулярною масою утримуються, в той час як вода і низькомолекулярні розчинені речовини проходять через дану мембрану. Ультрафільтрація являє собою поширений спосіб розділення для очищення і концентрування макромолекулярних розчинів, особливо білкових розчинів. Ультрафільтрація є схожою з нанофільтрацією, однак вони розрізняються по розмірах утримуваних молекул. У концепції даного винаходу, переважним є ізолювання молекулярної ваги 10 кДа (10 кДа УФ). УФ-мембрани, крім того, можуть бути використані для діафільтрації, для видалення солей і інших мікрочастинок з розчину за допомогою повторного або безперервного розведення і реконцентрації.

У переважному варіанті здійснення винаходу процес очищення включає одну або декілька стадій ультрафільтрації/діафільтрації і/або нанофільтрації. Ці стадії фільтрації можуть бути здійснені з використанням комерційно доступних фільтраційних пристроїв, наприклад, що є в наявності у GE Healthcare або Sartorius.

Ультрафільтрацію переважно здійснюють з використанням касет Sartocon і касет Sartocon Slice, що випускаються фірмою Sartorius.

Мембрана	Полієфірсульфон (PESU) або Hydrosart®
Ізольована молекулярна вага	10 кД
Фільтруюча поверхня	від 0,02 до 0,7 м ²
Тиск подачі	4 бар (58 фунт/кв. дюйм) максимум
pH стабільності	1-14
Робоча температура	50 °C максимум, при 20 °C
Очищення	1 M NaOH, 40 °C
Дезінфекція	1 M NaOH, 40-50 °C, 30 хв.
Зберігання	0,1 M NaOH

Полієфірсульфорова мембрана (PESU), використовується в касетах з перехресним потоком, що випускаються фірмою Sartorius, являє собою стабільний мембранний полімер, який має широкий спектр значень pH і температури.

Також можна використовувати ультрафільтраційні касети Hydrosart®, що випускаються компанією Sartorius. Hydrosart являє собою мембрану на основі стабілізованої целюлози, яка була оптимізована для біотехнологічного застосування. Ультрафільтраційні мембрани і касети Hydrosart доступні в наступних номінальних межах молекулярної маси: 2 кД, 5 кД, 10 кД і 30 кД.

У переважному варіанті здійснення спосіб очищення включає стадію нанофільтрації. Нанофільтрація може бути здійснена з використанням будь-якого ефективного нанофільтруючого пристрою. Нанофільтрацію переважно здійснюють з використанням фільтрів Planova, що є в наявності у фірми Asahi Kasei Medical Co., Ltd.

Фільтри Planova призначені для видалення вірусів під час виробництва біотерапевтичних готових лікарських форм, таких як біофармацевтичні препарати. Вони основані на мікропористій порожнистоволоконній мембрані, створеній з целюлози, регенованої гідрофільним мідноаміачним розчином, з вузьким розподілом пор, фільтри Planova доступні у вигляді одноразових автономних модулів в чотирьох середніх розмірах пор 15 нм, 19 нм, 35 нм і 72 нм (Planova 15N, 20N, 35N і 75N, відповідно). У технологічному процесі за винаходом переважним є використання фільтра Planova 15N, тобто фільтра, що має середній розмір пор 15 нм. Фільтр використовують відповідно до протоколу постачальника.

Переважно, щоб спосіб очищення ФСГ за винаходом не включав металоїонну афінну хроматографію.

Крім того, також переважно, щоб спосіб за винаходом дозволяв уникнути використання імуноафінної хроматографії. Очищення ФСГ без стадії імуноафінної хроматографії виключає можливість виникнення взаємодії домішок або інфекційних агентів, одержаних під час підготовки антитіла, із сполукою ФСГ.

У іншому варіанті здійснення, винахід стосується способу очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта рекомбінантного ФСГ, який включає стадію, на якій рідину, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ, піддають впливу мембранного катіонообмінника.

У переважному варіанті здійснення, мембранний катіонообмінник являє собою сильний кислотний катіонообмінник сульфонову кислоту, зафіксовану на мембрані, або обмінник, що має аналогічні характеристики.

Придатні мембранні адсорбери для використання в способі за винаходом відомі в рівні техніки і є в наявності у декількох постачальників. Наприклад, метод катіонообмінної хроматографії за винаходом може бути здійснений з використанням мембрани, яка виготовлена з регенованої целюлози і має хроматографічний матрикс з сульфонові кислоти, сформований на даному целюлозному каркасі. Прикладом придатного мембранного адсорбера є мембранні адсорбери Sartobind S membrane Adsorbers, що випускаються фірмою Sartorius. Їх технічні деталі представлені вище.

У іншому варіанті здійснення, спосіб очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта рекомбінантного ФСГ включає стадію, на якій рідину, що містить ФСГ, піддають мембранному катіонообміну, що додатково включає хроматографію гідрофобної взаємодії.

Метод хроматографії гідрофобної взаємодії за винаходом можна здійснити, як описано вище, застосовно до способу очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта рекомбінантного ФСГ, який включає стадії, на яких рідину, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ, піддають аніонообмінній хроматографії, хроматографії гідрофобних взаємодій і хроматографії по спорідненості до барвника, які здійснені в будь-якому порядку, причому спосіб не включає ні слабку аніонообмінну хроматографію, ні хроматографію з оберненою фазою, і його переважних варіантів здійснення.

У переважному варіанті здійснення, хроматографію гідрофобних взаємодій здійснюють з використанням смоли, що складається з гранул перехреснозшитої агарози, дереватизованої фенольними або бутильними групами, або смоли, що має аналогічні характеристики.

5 Якщо не вказане інше, наступні визначення призначені для пояснення і позначення значення і сфери застосування різних термінів, використаних для опису даного винаходу.

Термін "ФСГ" стосується поліпептиду фолікулостимулюючого гормону як повнорозмірного зрілого білка, який включає, але не обмежуючись цим, ФСГ людини або "лФСГ", або одержаний рекомбінантним способом, або виділений з організму людини, наприклад з сечі жінок, що знаходяться в постклімактеричному періоді. Послідовність білка глікопротеїну людини і
10 послідовність білка β -субодиниці ФСГ людини відомі фахівцю в даній галузі з наукової і патентної літератури (див., наприклад, WO 2004/087213).

Амінокислотна послідовність α -ланцюга ФСГ людини представлена в SEQ ID NO: 1 і амінокислотна послідовність β -ланцюга ФСГ людини представлена в SEQ ID NO: 2, які додані до цього опису. Ці амінокислотні послідовності відповідають амінокислотним послідовностям
15 дикого типу α - і β -ланцюгів ФСГ людини, як зареєстровано під інвентарним номером J 00152 в базі даних EMBL і під інвентарним номером NM_000510 в базі даних NCBI, відповідно.

Послідовності нуклеїнових кислот дикого типу, що кодують ФСГ людини, представлені в SEQ ID NO: 3 ($=\alpha$ -ланцюг) і 4 ($=\beta$ -ланцюг).

Рекомбінантний ФСГ може кодуватися послідовністю нуклеїнової кислоти дикого типу, яка є природною для людей, або він може кодуватися зміненою послідовністю нуклеїнової кислоти, експресія якої в результаті приводить до ФСГ, що має амінокислотну послідовність дикого типу, тобто послідовність білка дикого типу, властиву людині.
20

Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує ФСГ людини, може, наприклад, бути змінена таким чином, що одна або обидві послідовності нуклеїнових кислот, які кодують α - і β -ланцюги
25 ФСГ людини, є пристосованими для частоти використання кодонів в клітинах яєчника китайського хом'ячка (CHO), з метою підвищення рівня експресії і виходу рекомбінантного ФСГ в цих клітинах-хазяїнах.

Приклад послідовностей нуклеїнових кислот, які кодують ФСГ людини і які були модифіковані з урахуванням частоти використання кодонів в клітинах CHO, описані в міжнародній патентній заявці WO 2009/000913. Модифікована послідовність нуклеїнової
30 кислоти, що кодує β -ланцюг ФСГ людини, являє собою кодуючу область послідовності нуклеїнової кислоти, описаної в SEQ ID NO: 5 (в SEQ ID NO: 5 що кодує область починається з нуклеотиду 56 і продовжується до нуклеотиду 442), і модифікована послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує α -ланцюг ФСГ людини, являє собою кодуючу область послідовності
35 нуклеїнової кислоти, описаної в SEQ ID NO: 6 (в SEQ ID NO: 6 що кодує область починається з нуклеотиду 19 і продовжується до нуклеотиду 366). Клітинна лінія CHO, яка містить рекомбінантну молекулу нуклеїнової кислоти, що включає першу модифіковану послідовність, що кодує β -ланцюг ФСГ людини, і другу модифіковану послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує α -ланцюг ФСГ людини, була депонована 28 березня 2007 в базі даних DSMZ в
40 Braunschweig під депозитарним номером DSM ACC2833.

У переважному варіанті здійснення, рідка композиція ФСГ за даним винаходом містить рекомбінантний ФСГ дикого типу людини, який одержаний в результаті експресії рекомбінантного гена з послідовностей нуклеїнових кислот ФСГ, які модифіковані з урахуванням частоти використання кодонів в клітинах CHO відносно як β -ланцюга ФСГ людини,
45 так і α -ланцюга ФСГ людини. У іншому переважному варіанті здійснення, рекомбінантний ФСГ одержують в результаті експресії з послідовностей нуклеїнових кислот ФСГ, розкритих в WO 2009/000913.

Термін "варіант ФСГ" охоплює молекули, які відмінні амінокислотним складом, характером глікозилювання або міжсубодиничними зв'язками від ФСГ людини, але демонструють активність
50 ФСГ. Приклади включають СТР-FSH, модифікований рекомбінантний ФСГ пролонгованої дії, що складається з α -субодиниці дикого типу і гібридної β -субодиниці, де карбоксикінцевий пептид hCG злитий з С-кінцем β -субодиниці ФСГ, як описано у LaPolt et al. (1992) Endocrinology, 131, 2514-2520; або Klein et al. (2003) Human Reprod., 18, 50-56. Також враховується одностанцюжковий СТР-FSH, одностанцюжкова молекула, описана у Klein et al. (2002) Fertility &
55 Sterility, 77, 1248-1255. Інші приклади варіантів ФСГ включають молекули ФСГ, що мають додаткові ділянки глікозилювання, вбудовані в α - і/або β -субодиницю, як розкрито в міжнародній публікації WO 01/58493, і молекули ФСГ зі зв'язками S-S між субодиницею, як розкрито в WO 98/58957. Інші приклади варіантів ФСГ розкриті в WO 2004/087213, для яких характерні карбоксикінцеві делеції β -субодиниці. Інші приклади варіантів ФСГ включають молекули ФСГ,
60 що мають змінену міру глікозилювання в порівнянні з ФСГ дикого типу в результаті змін

амінокислотної послідовності білка, за допомогою яких вводиться додаткова ділянка (ділянки) глікозилювання або видаляється природна ділянка (ділянки) глікозилювання.

Крім того, ФСГ або варіант ФСГ за винаходом може являти собою молекулу ФСГ, яка була модифікована за допомогою хімічних речовин. Такі кон'югати ФСГ можуть, наприклад, містити

поліалкіленгліколь (наприклад, ПЕГ), гідроксіалкілкрохмаль (наприклад, HES) або інші полімерні молекули.

Гетеродимери ФСГ або гетеродимери варіанта ФСГ можуть бути одержані будь-яким придатним способом, наприклад рекомбінантно, за допомогою виділення або очищення з природних джерел або за допомогою хімічного синтезу, або за допомогою будь-якої їх комбінації.

Використання терміна "рекомбінантний" стосується композицій ФСГ або варіанта ФСГ, які одержані в результаті застосування технологій рекомбінантних ДНК (див., наприклад, міжнародну публікацію WO 85/01958). Послідовності геномної і кДНК клонів ФСГ відомі для α - і β -субодіниць декількох біологічних видів. Різні способи одержання рекомбінантного ФСГ або

варіантів ФСГ з використанням рекомбінантної технології описані в попередньому рівні техніки, див., наприклад, європейську патентну заявку EP 0711894 і європейську патентну заявку EP 0487512.

Переважно, ФСГ, очищений відповідно до винаходу, має α -субодіницю, відповідну послідовності SEQ ID NO: 1, і β -субодіницю, відповідну послідовності SEQ ID NO: 2.

У іншому аспекті, винахід стосується очищеного білка ФСГ або варіанта ФСГ, одержаного в результаті застосування способу очищення за винаходом.

Винахід додатково стосується фармацевтичної композиції, яка містить ФСГ або варіант ФСГ, очищений способом за винаходом, а також фармацевтично прийнятний ексципієнт. У переважному варіанті здійснення, фармацевтична композиція містить консервант і може бути використана для багаторазового застосування. Переважні фармацевтичні композиції описані в РСТ/EP2009/051451.

Крім того, винахід також стосується застосування ФСГ або варіанта ФСГ, очищеного способом за винаходом, або застосування фармацевтичної композиції, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ в комбінації з фармацевтично прийнятними ексципієнтами, при лікуванні порушень фертильності.

Рекомбінантний ФСГ людини очищають з супернатанту культури клітин-хазяїнів способом за винаходом. Рекомбінантний людський ФСГ або варіант ФСГ переважно одержують, як описано в міжнародній патентній заявці WO 2009/000913.

Найбільш переважно, ФСГ являє собою людський ФСГ, одержаний рекомбінантно, зокрема переважно одержаний в клітинах яєчника китайського хом'ячка, трансфєкованих вектором або векторами, що містять ДНК, яка кодує глікопротеїн α -субодіниці і β -субодіниці ФСГ людини, кодовані або послідовностями SEQ ID NO: 3 і 4 (= послідовності нуклеїнових кислот дикого типу), або послідовностями SEQ ID NO: 5 і 6 (= кодон-оптимізовані послідовності нуклеїнових кислот). ДНК, які кодують α - і β -субодіниці, можуть знаходитися в одному і тому ж або в різних векторах.

Рекомбінантний ФСГ має декілька переваг над його аналогом, виділеним з сечі. Методи культивування і виділення з використанням рекомбінантних клітин забезпечують відповідність між експериментальними серіями. На відміну від цього, ФСГ, виділений з сечі, значно розрізняється від серії до серії такими характеристиками, як чистота, характер глікозилювання, сіалування і окислення субодіниць. В результаті кращої відповідності характеристик між серіями і чистоти рекомбінантного ФСГ, даний гормон може бути швидко ідентифікований і визначений кількісно з використанням таких технологій, як ізоелектричне фокусування (IEF). Простота ідентифікації і кількісного визначення рекомбінантного ФСГ дозволяє наповнювати ампули по масі гормону (заповнення по масі), а не на основі біооцінки.

Термін "активність ФСГ" стосується здатності сполуки ФСГ викликати біологічні реакції, пов'язані з ФСГ, такі як збільшення маси яєчника в тесті Steelman-Pohley (Steelman et al. (1953) Endocrinology 53, 604-616) або фолікулярного росту у пацієнтки. Фолікулярний ріст у пацієнтки може бути оцінений за допомогою ультразвукового дослідження, наприклад, в перерахунку на фолікули, що мають середній діаметр приблизно 16 мм на 8 день стимуляції. Біологічну активність оцінюють відносно загальноприйнятого стандарту для ФСГ.

Специфічна біоактивність рекомбінантного ФСГ in vivo знаходиться, звичайно, в діапазоні від приблизно 8000 МО ФСГ/мг білка до приблизно 16000 МО ФСГ/мг білка. Наприклад, рекомбінантний ФСГ в комерційно доступному продукті Puregon (Organon) має специфічну біоактивність приблизно 10000 МО/мг білка, а для Gonal-f від Serono біоактивність рекомбінантного ФСГ людини становить приблизно 13600 МО/мг білка.

Активність ФСГ може бути визначена відомими способами, що стосуються ФСГ і інших гонадотропінів. Такі способи включають, наприклад, аналіз імунної активності ферменту (EIA) або аналіз гена-репортера. Біоактивність звичайно визначають за допомогою біотесту, описаного в 5 Виданні Європейської фармакопеї (European Pharmacopoeia, 5th Edition) для ФСГ, виділеного з сечі, біоактивність оцінюють в результаті порівняння ефекту ФСГ на збільшення яєчників нестатевозрілих щурів, підданих впливу хоріонічного гонадотропіну з таким же ефектом Стандартного Препарату.

Біологічну активність ФСГ або варіанта ФСГ можна оцінити, порівнюючи, при заданих умовах, його ефект на збільшення яєчників нестатевозрілих щурів, підданих впливу хоріонічного гонадотропіну, з таким же ефектом, використовуючи міжнародний стандартний препарат або еталонний препарат, відкалібрований в Міжнародних Одиницях (Європейська Фармакопея, 5 Видання).

Вимірювання активності ФСГ *in vitro* описане, наприклад, у Albanese et. al. (1994) Mol. Cell Endocrinol. 101: 211-219.

Чистота ФСГ або варіанта ФСГ, одержаного способом за винаходом, складає щонайменше 95 %, переважно щонайменше 97 %, більш переважно щонайменше 99 % і найбільш переважно більше ніж 99 %. Міра чистоти може бути визначена за допомогою аналізу методом ВЕРХ. Придатні матеріали і протоколи для проведення такого аналізу можуть бути одержані від комерційних постачальників, таких як Vydas або TOSOH Bioscience.

Подальші приклади представлені виключно для додаткової ілюстрації способу очищення за винаходом. Сфера застосування винаходу не повинна розглядатися як така, що усього лише складається з наступних прикладів.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Одержання рекомбінантного ФСГ людини за допомогою рекомбінантних технологій

Рекомбінантний ФСГ людини продукується в трансфектованих клітинах-хазяїнах СНО стандартними способами. Ці методи включають одержання клону клітини СНО, який продукує рекомбінантний ФСГ людини з однієї або декількох рекомбінантних молекул нуклеїнових кислот, що кодують α -ланцюг і β -ланцюг ФСГ людини, і культивування даних клітин-хазяїнів при відповідних умовах. Рекомбінантний ФСГ людини потім очищають з клітинної культури відповідно до винаходу.

У переважному варіанті здійснення рекомбінантний ФСГ людини одержують, як описано в міжнародній патентній заявці WO 2009/000913.

Приклад 2

Очищення ФСГ з клітинної культури

Процедура очищення являє собою наступне:

Стадія аніонообмінної хроматографії

↓

Стадія НІС (хроматографія гідрофобних взаємодій)

↓

Стадія хроматографії по спорідненості до барвника

↓

Вірусна інактивація

↓

10 кДа УФ/ДФ (ультрафільтрація/діафільтрація)

↓

Катіонний мембранний адсорбер

↓

Стадія аніонообмінної хроматографії

↓

10 кДа УФ (ультрафільтрація)

↓

Стадія ексклюзійної хроматографії

↓

Нанофільтрація

Тривалість ферментації становила 28 днів і ферментаційний об'єм становив 30 л. Вихід становив 0,22 мкм, профільтрований і розбавлений RO-водою (вода, очищена за допомогою зворотного осмосу) в 3,5 разу.

Стадія аніонообмінної хроматографії (АЕС)

Розбавлений одержаний супернатант клітинної культури піддавали аніонообмінній хроматографії з використанням сильної аніонообмінної смоли на основі четвертинного амонію, відомої в рівні техніки як UNOsphere Q. Цей матрикс є в наявності у BioRad.

Для зрівноваження використовували три об'єми колонки (OK) 50 mM Tris-HCl, pH 7,6. Колонку навантажували зібраним супернатантом (розбавленим RO-водою у співвідношенні 1:3,5; титр зібраного супернатанту становив приблизно 1,8 мкг ФСГ/мл) і відмивали за допомогою 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 (5 OK). Потім колонку відмивали за допомогою 50 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7,6 (5 OK), і білок був елюйований з використанням 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,6 (8 OK). На даній стадії вихід становив 90 % і більше.

10 Стадія НІС

НІС здійснювали з використанням смоли, що складається з гранул перехреснозшитого агарози, дериватизованої фенілом. Фенілсефароза 6 FF (є в наявності у GE Healthcare) є надзвичайно структурованим похідним на основі агарози. Ця речовина є фізично і хімічно стабільною, забезпечуючи високу швидкість потоку і підвищений термін експлуатації смоли. Технічні характеристики цієї смоли представлені вище.

Вісім елюатів, одержаних на стадії АЕС, були об'єднані і розбавлені в 3 рази з використанням 50 mM Tris-HCl, 4,5 NaCl, pH 7,6. НІС-колонка була зрівноважена за допомогою 50 mM Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,6 (4 OK) і навантажена елюатом, одержаним на стадії АЕС, розбавленим у співвідношенні 1:3. Потім колонку відмивали з використанням 50 mM Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,6 (3 OK) і відмивали з використанням 50 mM Tris-HCl, 1,8 M NaCl, pH 7,6 (5 OK). Було виявлено, що даний відмиваючий буфер з 1,8 M NaCl має хороший потенціал очищення без помітної втрати ФСГ. Даний білок потім був елюйований за допомогою 50 mM Tris-HCl, 0,8 M NaCl, pH 7,6 (6 OK).

Вихід ФСГ на даній НІС-стадії становив >95 % без яких-небудь значних втрат під час навантаження, і з хорошим потенціалом очищення загального білка з приблизним фактором 10. Ці результати демонструють, що проведена НІС-стадія являє собою дуже ефективну стадію очищення із задовільним виходом і якістю продукту.

Стадія хроматографії по спорідненості до барвника

На даній стадії хроматографії по спорідненості до барвника використовували Blue Sepharose FF, що є в наявності у GE Healthcare. Елюат, одержаний на стадії НІС, був розбавлений в 4 рази за допомогою 50 mM Tris-HCl, pH 7,6. Колонку зрівноважували за допомогою 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 (3 OK) і навантажували розбавленим у співвідношенні 1:4 елюатом, одержаним на стадії НІС. Колонку відмивали за допомогою 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 (3 OK), і білок ФСГ був елюйований за допомогою 50 mM Tris-HCl, 4 M NaCl, pH 7,6 (6 OK).

Після афінної хроматографії була проведена стадія вірусної інактивації за допомогою інкубування даного елюату в 15 % 2-пропанолі протягом 2 годин. Для цієї мети елюат, одержаний на стадії хроматографії по спорідненості до барвника, був розбавлений 2 рази за допомогою 50 mM Tris-HCl, 30 % 2-пропанолом, pH 7,6, в результаті одержавши 50 mM Tris-HCl, 15 % 2-пропанол, 2 M NaCl, pH 7,6. Після інкубування протягом 2 годин даний одержаний на стадії хроматографії по спорідненості до барвника вірусно інактивований елюат був розведений в 2 рази за допомогою 20 mM Tris-HCl, pH 7,0.

10 кДа УФ/ДФ

Ультра- і діалільтрацію в більшості випадків проводили згідно зі стандартними протоколами. Ефективними пристроями для УФ/ДФ є ультрафільтраційні/діалільтраційні касети (поліетерсульфон (PESU), 10 кД) виробництва Sartorius (площа фільтра: 14000 см², УФ-фактор: 13-20, ДФ-фактор: 8-10, навантаження: від 0,1 до 0,5 мг ФСГ/см²). Діалільтрацію з пристроями для УФ/ДФ в більшості випадків проводили з ультрафільтраційними (концентрація) факторами від 13 до 20 і діалільтраційними факторами від 8 до 10.

Вірусно інактивований елюат, одержаний на стадії хроматографії по спорідненості до барвника, був діаліфільтований в буфері Tris-HCl (20 mM Tris-HCl, pH 7,0) і навантажений безпосередньо на катіонний мембранний адсорбер.

Стадія катіонного мембранного адсорбера

Метод катіонообмінної хроматографії за даним винаходом був здійснений із застосуванням мембрани, яка виготовлена з регенованої целюлози і має хроматографічний матрикс з сульфонові кислоти, сформований на даному целюлозному каркасі. Такий мембранний адсорбер є в наявності у Sartorius під комерційною назвою Sartobind S membrane adsorber. Мембранний адсорбер Sartobind S являє собою капсулу з декількома мембранними шарами, на яких іммобілізований ліганд. Мембранні адсорбери мають перевагу короточасного технологічного процесу і малих об'ємів буфера. Собівартість тесту і часові витрати незначні у зв'язку з одноразовим використанням.

Мембранний адсорбер зрівнювали за допомогою 20 мМ Tris-HCl, pH 7,0 (200 мл) і навантажували ультраконцентратом 10 кДа УФ/ДФ (приблизно 100 мл). Даний адсорбер відмивали за допомогою 20 мМ Tris-HCl, pH 7,0 (200 мл).

Технологічний процес на основі мембранного адсорбера проходить в проточному режимі, що скорочує тривалість процесу. Крім того, немає необхідності в регулюванні умов навантаження відносно наступної стадії обробки (аніонообмінна хроматографія). Вихід продукту в даному проточному процесі був дуже хорошим. Фактично, не було втрати продукту під час процесу з використанням модуля Sartobind S при значеннях pH 6,0, 6,5 і 7,0 в різних буферних системах.

Стадія з використанням катіонного мембранного адсорбера є дуже ефективною для очищення НСР (білок клітини-хазяїна). Вихід, від 90 до 95 %, є дуже сприятливим, оскільки очищений ФСГ не зв'язується з адсорбером при значенні pH 7,0 в буферній системі 20 мМ Tris-HCl.

Стадія аніонообмінної хроматографії

Другу аніонообмінну хроматографію здійснювали з використанням сильної аніонообмінної смоли на основі четвертинного амонію, відомої в рівні техніки як Q Sepharose HP. Ця смола є в наявності у GE Healthcare.

АЕС-колонку зрівнювали за допомогою 20 мМ Tris-HCl, pH 7,0 (3 ОК). Одержану за допомогою проточного мембранного адсорбера рідину навантажували на колонку (3 ОК), і дану колонку спочатку відмивали за допомогою 20 мМ Tris-HCl, pH 7,0 (2 ОК), потім за допомогою 20 мМ Tris-HCl, pH 8,5 (3 ОК) і на закінчення відмивали за допомогою 20 мМ Tris-HCl, 60 мМ NaCl, pH 8,5 (5 ОК). Потім ФСГ елюювали за допомогою 20 мМ Tris-HCl, 130 мМ NaCl, pH 8,5 (6 ОК).

Елюат, одержаний з Q Sepharose HP, має дуже високу міру чистоти, порівнянну з комерційним продуктом GONAL-f®.

10 кДа УФ

Ультрафільтрацію 10 кДа проводили згідно зі стандартними протоколами з використанням ультрафільтраційної касети Sartocap (PESU, 10 кД) виробництва Sartorius (площа фільтра: 3000 см², УФ-фактор: 10-30, навантаження: від 0,2 до 1,0 мг ФСГ/см²). Ультрафільтрацію проводили в більшості випадків з використанням ультрафільтраційних (концентрування) факторів від 10 до 30.

Стадія ексклюзійної хроматографії (SEC)

Ексклюзійну хроматографію здійснювали з використанням Superdex 75 pg, є в наявності у GE Healthcare. Колонку зрівнювали за допомогою 50 мМ Na-PO₄, pH 7,0 (2 ОК). Одержаний на стадії УФ 10 кД ретентат навантажували на дану колонку (0,025 ОК), і колонку відмивали за допомогою 50 мМ Na-PO₄, pH 7,0 (2 ОК).

Елюат, одержаний на стадії SEC, має високу міру чистоти, в такому ж діапазоні, як комерційний продукт GONAL-f®.

Нанофільтрація

На закінчення, здійснювали нанофільтрацію елюату, одержаного на стадії SEC, використовуючи фільтри Planova 15N, що випускаються компанією Asahi Kasei Medical Co., Ltd., середній розмір пор становить 15 нм. Розрахункове максимальне навантаження становило 2,5 мл/см². Дану фільтрацію здійснювали відповідно до протоколу фірми-постачальника.

Чистоту очищеного ФСГ визначали за допомогою SE-HPLC (ексклюзійна ВЕРХ) і SDS-PAGE. Чистота і передбачені домішки одержаного ФСГ були наступні:

SE-HPLC (димери і споріднені домішки з вищою молекулярною масою)	<1 %
SDS-PAGE red. (колоїдальний)	чистота >97 %
НСР (родовий)	<10 ppm
ДНК	<0,006 пг/МО ФСГ

Біоактивність даного рекомбінантного ФСГ людини складала щонайменше приблизно 10000 МО/мг. Переважно біоактивність рекомбінантного ФСГ людини або варіанта ФСГ знаходиться в діапазоні приблизно від 10000 МО/мг приблизно до 17000 МО/мг, більш переважно біоактивність складає щонайменше приблизно 12000 МО/мг і найбільш переважно біоактивність складає щонайменше приблизно 15000 МО/мг.

Список послідовностей:

SEQ ID NO: 1: амінокислотна послідовність α -ланцюга ФСГ людини,

SEQ ID NO: 2: амінокислотна послідовність β -ланцюга ФСГ людини,

SEQ ID NO: 3: послідовність нуклеїнової кислоти дикого типу, що кодує α -ланцюг ФСГ людини,

SEQ ID NO: 4: послідовність нуклеїнової кислоти дикого типу, що кодує β -ланцюг ФСГ людини,

5 SEQ ID NO: 5: послідовність нуклеїнової кислоти з оптимізованими кодонами, що кодує β -ланцюг ФСГ людини,

SEQ ID NO: 6: послідовність нуклеїнової кислоти з оптимізованими кодонами, що кодує α -ланцюг ФСГ людини.

10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб очищення рекомбінантного ФСГ або варіанта рекомбінантного ФСГ, який включає стадії, на яких рідину, що містить вказаний ФСГ або варіант ФСГ, піддають:

- аніонообмінній хроматографії,

15 - хроматографії гідрофобних взаємодій і

- хроматографії по спорідненості до барвника,

які здійснюють в будь-якому порядку, причому спосіб не включає ні слабку аніонообмінну хроматографію, ні хроматографію з оберненою фазою.

2. Спосіб за п. 1, в якому стадії здійснюють в наступному порядку:

20 а) аніонообмінна хроматографія,

б) хроматографія гідрофобних взаємодій і

с) хроматографія по спорідненості до барвника.

3. Спосіб за п. 1 або 2, де аніонообмінну хроматографію здійснюють з використанням сильної аніонообмінної смоли, що має функціональні групи $-N^+(CH_3)_3$, або смоли, що має аналогічні

25 характеристики.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, де хроматографію гідрофобних взаємодій здійснюють з використанням смоли, що складається з гранул перехреснозшитої агарози, дереватизованої фенільними або бутильними групами, або смоли, що має аналогічні характеристики.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, де хроматографію по спорідненості до барвника здійснюють з використанням Cibacron Blue 3G як ліганду, ковалентно зв'язаного з будь-яким матриксом.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, де хроматографію здійснюють з використанням буфера Tris-HCl/хлорид натрію як елюенту при значенні рН в діапазоні від 7,0 до 9,0.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який додатково включає стадію катіонообмінної хроматографії.

8. Спосіб за п. 7, де мембранну катіонообмінну хроматографію здійснюють з сильним кислотним катіонообмінником сульфоновую кислотою, зафіксованою на мембрані, або обмінником, що має аналогічні характеристики.

35 9. Спосіб за п. 7 або 8, де стадії здійснюють в наступному порядку:

а) аніонообмінна хроматографія,

б) хроматографія гідрофобних взаємодій,

40 с) хроматографія по спорідненості до барвника і

д) катіонообмінна хроматографія.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який додатково включає додаткову аніонообмінну хроматографію.

11. Спосіб за п. 10, де аніонообмінну хроматографію здійснюють з використанням сильної аніонообмінної смоли, що має функціональні групи $-N^+(CH_3)_3$, або смоли, що має аналогічні

45 характеристики.

12. Спосіб за п. 10 або 11, де аніонообмінну хроматографію здійснюють з використанням буфера Tris-HCl/хлорид натрію як елюенту при значенні рН в діапазоні від 7,0 до 9,0.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 10-12, де стадії здійснюють в наступному порядку:

50 а) перша аніонообмінна хроматографія,

б) хроматографія гідрофобних взаємодій,

с) хроматографія по спорідненості до барвника,

д) необов'язкова катіонообмінна хроматографія і

е) друга аніонообмінна хроматографія.

55 14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який додатково включає ексклюзивну хроматографію.

15. Спосіб за п. 14, де ексклюзивну хроматографію здійснюють з використанням матриксу зі сферичного композиту перехреснозшитої агарози і декстрану.

16. Спосіб за п. 14 або 15, де стадії здійснюють в наступному порядку:

60 а) перша аніонообмінна хроматографія,

б) хроматографія гідрофобних взаємодій,

- c) хроматографія по спорідненості до барвника,
 - d) необов'язкова катіонообмінна хроматографія,
 - e) необов'язкова друга аніонообмінна хроматографія і
 - f) ексклюзивна хроматографія.
- 5 17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-16, який включає наступні стадії в наступному порядку:
- a) перша аніонообмінна хроматографія,
 - b) хроматографія гідрофобних взаємодій,
 - c) хроматографія по спорідненості до барвника,
 - d) мембранний катіонообмін,
- 10 e) друга аніонообмінна хроматографія і
- f) ексклюзивна хроматографія.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, який додатково включає одну або декілька стадій ультрафільтрації і/або нанофільтрації.
19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-18, в якому не здійснюють металоїонну афінну хроматографію.
- 15 20. Спосіб за будь-яким з пп. 1-19, в якому не здійснюють імуноафінну хроматографію.
21. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, де даний ФСГ має α -субодиницю відповідно до послідовності SEQ ID NO: 1 і β -субодиницю відповідно до послідовності SEQ ID NO: 2.
22. ФСГ або варіант ФСГ, одержаний способом за пп. 1-21, який містить менше ніж 1 % димерів і споріднених домішок з вищою молекулярною масою, менше ніж 10 ppm загального білка
- 20 клітини хазяїна (HCP), менше ніж 0,006 пг/МО ФСГ ДНК і який має чистоту більше ніж 97 %.
23. Фармацевтична композиція, яка містить ФСГ або варіант ФСГ за п. 22, а також фармацевтично прийнятний ексципієнт.
24. Застосування ФСГ або варіанта ФСГ за п. 22 або фармацевтичної композиції за п. 23 для лікування порушень фертильності.
- 25 25. Спосіб одержання рекомбінантного людського ФСГ, який містить етапи:
- a) одержання клону клітин CHO, який продукує рекомбінантний людський ФСГ з однієї або декількох рекомбінантних молекул нуклеїнових кислот, що кодують α -ланцюг і β -ланцюг ФСГ людини,
 - b) культивування клітин-хазяїнів CHO у відповідних умовах і
- 30 c) очищення рекомбінантного людського ФСГ з культури клітин способом за будь-яким з пп. 1-21.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Biogenerix AG
 <120> Спосіб очищення рекомбінантного ФСТ
 <130> В 9682/RN
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ЛАНЦЮГ
 <222> (1)..(116)
 <223> альфа-ланцюг ФСТ людини
 <400> 1
 Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
 20 25 30
 Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
 35 40 45
 Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
 50 55 60
 Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
 65 70 75 80
 Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
 85 90 95
 Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
 100 105 110
 Tyr His Lys Ser
 115
 <210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> ЛАНЦЮГ
 <222> (1)..(129)
 <223> бета-ланцюг ФСТ людини

<400> 2

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1 5 10 15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
 20 25 30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
 50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
 65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 85 90 95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
 115 120 125

Glu

<210> 3
 <211> 369
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> послідовність нуклеїнової кислоти дикого типу, що кодує
 альфа-ланцюг ФСТ людини

<400> 3
 cttaattaag ccgccagcat ggattactac agaaaatatg cagctatctt tctgggcaca 60
 ttgtcggtgt ttctgcatgt tctccattcc gctcctgatg tgcaggattg cccagaatgc 120
 acgctacagg aaaacccatt cttctcccag ccgggtgccc caatacttca gtgcatgggc 180
 tgctgcttct ctagagcata tccactcca ctaagggtcca agaagacgat gttggtccaa 240
 aagaacgtca cctcagagtc cacttgctgt gtagctaaat catataacag ggtcacagta 300

```

atgggggggt tcaaagtgga gaaccacacg gcgtgccact gcagtacttg ttattatcac 360
aaatcttaa 369

```

```

<210> 4
<211> 474
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> послідовність нуклеїнової кислоти дикого типу, що кодує
        бета-ланцюг ФСТ людини

```

```

<400> 4
aggatccccg ggctacctcc ccgcggggag gcgcgccctt taattaagcc gccaccatga 60
agacactcca gttttttctt cttttctgtt gctggaaagc aatctgctgc aatagctgtg 120
agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc ataagcatca 180
acaccacttg gtgtgtggc tactgtctaca ccagggatct ggtgtataag gacccagcca 240
ggcccaaat ccagaaaaca tgtaccttca aggaactggg atatgaaaca gtgagagtgc 300
ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacataccc agtggccacc cagtgtcact 360
gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggcctgggg cccagctact 420
gtccctttgg tgaatgaaa gaataaacat gccatggcat gcgagctcga attc 474

```

```

<210> 5
<211> 471
<212> ДНК
<213> Штучна

```

```

<220>
<223> кодон-оптимізована послідовність нуклеїнової кислоти,
        що кодує бета-ланцюг ФСТ людини

```

```

<400> 5
aggatccccg ggtacctccc ccgcggggag gcgcgccctt aattaagccg ccaccatgaa 60
gacctgcag ttcttcttcc tgttctgtg ctggaaggcc atctgctgca acagctgcga 120
gctgaccaac atcaccatcg ccatcgagaa ggaggagtgc aggttctgca tcagcatcaa 180
caccacctgg tgcgcgggat actgtacac cagggacctg gtgtacaagg accccgccag 240
gcccaagatc cagaagacct gcaccttcaa ggagctgggtg tacgagaccg tgaggggtgcc 300
cggtctgcgc caccacgccg acagcctgta cacctacccc gtggccaccc agtgccactg 360
cggcaagtgc gacagcgaca gcaccgactg caccgtgagg ggccctgggc ccagctactg 420
cagcttcggc gagatgaagg agtaatgacc atggcatgcg agctcgaatt c 471

```

```

<210> 6
<211> 372
<212> ДНК

```

```

<213> Штучна

```

```

<220>
<223> кодон-оптимізована послідовність нуклеїнової кислоти,
        що кодує альфа-ланцюг ФСТ людини

```

```

<400> 6
cttaattaag ccgccagcat ggactactac aggaagtacg ccgccatctt cctggtgacc 60
ctgagcgtgt tctgtcacgt gctgcacagc gcccagacg tgcaggactg ccccgagtgc 120
accctgcagg agaaccatt cttagccag cccggagccc ccatcctgca gtgcatgggc 180
tgctgcttca gcagggccta cccaccccc ctgaggagca agaagacat gctgggtgcag 240
aagaacgtga ccagcgagag caccgtgtgc gtggccaaga gctacaacag ggtgaccgtg 300
atggcgggct tcaaggtgga gaaccacacc gcctgccact gcagcacctg ctactaccac 360
aagagctaataat ga 372

```

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601